



УДК 594.133:591.11/.12

**ВЛИЯНИЕ СУТОЧНОЙ ГИПОКСИИ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОЦИТОВ
ANADARA KAGOSHIMENSIS (TOKUNAGA, 1906)**

© 2020 г. **Е. С. Кладченко, А. Ю. Андреева, Т. А. Кухарева,
В. Н. Рычкова, А. А. Солдатов**

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей
имени А. О. Ковалевского РАН», Севастополь, Российская Федерация
E-mail: kladchenko_ekaterina@bk.ru

Поступила в редакцию 27.07.2020; после доработки 21.09.2020;
принята к публикации 25.12.2020; опубликована онлайн 30.12.2020.

Марикультурные хозяйства традиционно расположены в прибрежных участках, где моллюски могут подвергаться воздействию гипоксии. Культивирование в условиях дефицита кислорода приводит к снижению темпов роста, вспышкам заболеваний на фермах и массовой гибели моллюсков. Методом проточной цитометрии исследовано влияние краткосрочной гипоксии на функциональные показатели гемоцитов анадары (*Anadara kagoshimensis*). Контрольную группу содержали при 6,7–6,8 мг $O_2 \cdot л^{-1}$, опытную — при 0,4–0,5 мг $O_2 \cdot л^{-1}$. Экспозиция — 24 часа. Содержание кислорода в воде снижали, продувая её газообразным азотом. В гемолимфе моллюска на основании относительного размера и относительной гранулярности идентифицировано две группы гемоцитов: гранулоциты (эритроциты) и агранулоциты (амёбоциты). Эритроциты — преобладающий тип клеток в гемолимфе *A. kagoshimensis*: их доля составила более 90 % от общего числа клеток. Суточная гипоксия не привела к изменениям клеточного состава гемолимфы анадары. Способность к продукции активных форм кислорода и уровень смертности гемоцитов моллюсков экспериментальной группы также остались на уровне контрольных значений. Результаты проведённого исследования свидетельствуют о толерантности анадары к условиям острого дефицита кислорода.

Ключевые слова: анадара, марикультура, проточная цитометрия, гематологические показатели, активные формы кислорода

Гипоксические зоны широко представлены в шельфовой зоне морских акваторий (Dang et al., 2013 ; Diaz & Rosenberg, 2008). Садки с моллюсками традиционно располагают в прибрежных участках, где они могут подвергаться воздействию устойчивой или периодической гипоксии, что приводит к снижению темпов роста, вспышкам заболеваний на фермах и массовой гибели моллюсков (Andreyeva et al., 2019 ; De Zwaan et al., 1991 ; Nicholson & Morton, 1998 ; Sussarellu et al., 2013). Последнее обуславливает актуальность поиска для культивирования видов с широким адаптивным потенциалом к дефициту кислорода. Основные объекты культивирования на Черноморском побережье — *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 и *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Яхонтова и Дергалева, 2008).

Известно, что при дефиците кислорода у мидий ухудшаются физиологические показатели, такие как интенсивность фильтрации, частота дыхания и скорость роста (Wang & Widdows, 1991). Наиболее пагубное влияние гипоксические условия оказывают на молодёжь мидий и устриц, в частности на их рост, расселение и выживаемость (Baker and Mann, 1992). Это объясняется тем, что в условиях гипоксии личинки данных моллюсков вынуждены снижать энергозатраты на процессы приёма пищи, пищеварения и роста, тем самым уменьшая потребность в кислороде (Wang et al., 2012 ; Wang & Widdows, 1991).

Двустворчатый моллюск *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906), принадлежащий к семейству Arcidae, рассматривается как перспективный вид для промышленного культивирования на Черноморском побережье (Яхонтова и Дергалева, 2008). Это обусловлено широким ареалом анадары, высокими темпами роста и способностью наращивать биомассу при высокой плотности посадки (Яхонтова и Дергалева, 2008). Между тем разработка технологии воспроизводства нетипичного для региона объекта культивирования требует понимания его физиологических реакций на стрессовые факторы окружающей среды, в частности гипоксию.

О физиологическом состоянии организма моллюска можно судить по функциональному состоянию гемоцитов — клеток, циркулирующих в гемолимфе. Физиологическое воздействие дефицита кислорода оценивают по изменению соотношения типов гемоцитов, а также по показателям неспецифического иммунного ответа (генерация активных форм кислорода (далее — АФК) и фагоцитарная активность) и пролиферации гемоцитов (Sussarellu et al., 2013, 2010). Проведено множество исследований влияния краткосрочной гипоксии на традиционные объекты культивирования — *M. galloprovincialis* и *C. gigas* (Новицкая и Солдатов, 2011 ; Sussarellu et al., 2012, 2013, 2010 ; Wu, 2002). Известно, что в результате воздействия гипоксии у устриц происходит ряд физиологических нарушений на клеточном уровне: снижается интенсивность митохондриального дыхания (Sui et al., 2016), увеличивается экспрессия генов антиоксидантных ферментов (Sussarellu et al., 2013). Кроме того, зарегистрированы случаи повреждения клеток, в частности циркулирующих в гемолимфе гемоцитов (Hermes-Lima, 2015). Следствием последнего может стать подавление иммунных функций (Donaghy et al., 2013). Общее число гемоцитов при этом возрастает, что может быть обусловлено их пролиферативной активностью в условиях гипоксии (Sussarellu et al., 2010). У мидий, испытывавших недостаток кислорода, количество гранулоцитов возрастает, тогда как число агранулоцитов, напротив, сокращается (Andreyeva et al., 2019). Снижение продукции АФК в гемоцитах устриц и мидий негативно влияет на их защитные функции (Andreyeva et al., 2019 ; Boyd et al., 1999).

Анадару *A. kagoshimensis* считают видом, устойчивым к дефициту кислорода благодаря гемоглобину в пигментированных гемоцитах — эритроцитах (Soldatov et al., 2010, 2018). Она может выживать в течение нескольких недель в условиях глубокой гипоксии (Holden et al., 1994 ; Mydlarz et al., 2006). Толерантность к дефициту кислорода обеспечена за счёт способности к эффективно-анэробному метаболизму (Новицкая и Солдатов, 2011 ; Cortesi et al., 1992 ; Isani et al., 1986 ; Miyamoto & Iwanaga, 2012). Известно, что даже в условиях острой гипоксии анадара может поддерживать внутриклеточный энергетический баланс на сравнительно высоком уровне (Cortesi et al., 1992 ; Novitskaya & Soldatov, 2013). Кроме того, гипоксия не приводит к лизису эритроцитов этого моллюска (Andreyeva et al., 2019 ; Zwaan et al., 1995). Однако отмечено, что после трёх суток инкубации в условиях гипоксии изменяются морфологические параметры эритроцитов (Wang & Widdows, 1991). Влияние гипоксии на параметры клеточного иммунитета гемоцитов *A. kagoshimensis* до настоящего времени неизвестно. Основываясь на имеющихся данных, нельзя сделать заключение об иммунном статусе гемоцитов анадары в условиях гипоксии. Вместе с тем именно подавление иммунных функций может приводить к массовой гибели моллюсков (Wang & Widdows, 1991 ; Widdows et al., 1989), что создаёт проблемы для марикультурных хозяйств.

Цель настоящей работы — в ходе экспериментов *in vivo* исследовать влияние суточной гипоксии на функциональные показатели гемоцитов двустворчатого моллюска *A. kagoshimensis*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Двустворчатых моллюсков *A. kagoshimensis* (длина раковины — $(15,2 \pm 6,1)$ мм; вес — $(30,6 \pm 2,8)$ г; $n = 20$) собирали в бухте Севастопольская (г. Севастополь) в июне 2019 г. Для снятия состояния стресса, вызванного отловом и транспортировкой, анадарту содержали в ёмкостях с проточной морской водой из расчёта 3–5 л на особь; концентрацию кислорода поддерживали на уровне 6,7–6,8 мг $O_2 \cdot л^{-1}$ в течение недели. Гипоксические условия создавали путём продувания воды в аквариумах с моллюсками газообразным азотом до достижения концентрации 0,4–0,5 мг $O_2 \cdot л^{-1}$. Экспозиция анадарту в условиях гипоксии продолжалась 24 ч. Контрольную группу ($n = 10$) содержали при концентрации кислорода 6,7–6,8 мг $O_2 \cdot л^{-1}$.

Гемолимфу отбирали стерильным шприцем из экстрапалиального пространства. Оставшиеся клетки ресуспензировали в стерильной морской воде (концентрация гемоцитов — от $1 \cdot 10^6$ до $2 \cdot 10^6$ кл. $мл^{-1}$). Функциональные характеристики гемоцитов анализировали на проточном цитометре Beckman Coulter FC 500. Для идентификации типов клеток и оценки содержания ДНК готовую суспензию гемоцитов окрашивали ДНК-красителем SYBR Green I (финальная концентрация в пробе — 10 мкмоль; время инкубации — 30 минут в темноте). Содержание ДНК в гемоцитах моллюсков анализировали на основании гистограмм распределения флуоресценции красителя в канале FL1 при помощи программы Flowing Software 5.2. По оси абсцисс на гистограмме — содержание ДНК в клетках, по оси ординат — число клеток.

Оценку способности гемоцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода проводили методом проточной цитометрии по флуоресценции красителя 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата (DCF-DA): 1 мл суспензии гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 30 минут в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкмоль. Флуоресценцию красителя анализировали в канале FL1 проточного цитометра (зелёная область спектра).

Уровень смертности гемоцитов определяли с использованием флуоресцентного красителя йодистого пропидия (PI). К 1 мл суспензии гемоцитов добавляли 10 мкл раствора PI (Sigma Aldrich) и инкубировали в темноте в течение 30 минут при $+4$ °С. Долю мёртвых гемоцитов в общем числе гемоцитов оценивали по гистограммам флуоресценции PI в канале FL4 (красная область спектра).

Калибровку протокола для анализа относительного размера клеток проводили при помощи флуоресцентных микросфер диаметром 0,9; 2,0; 4,2; 5,7; 9,0 мкм. Нормальность распределения проверяли по критерию Шапиро — Уилка. Статистическую значимость различий оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента при $p \leq 0,05$. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок ($mean \pm SE$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пик флуоресценции красителя SYBR Green I у гемоцитов был неоднороден и характеризовался относительно высоким коэффициентом вариации (*CV*) в условиях как нормоксии [$(21,6 \pm 1,4)$ %], так и гипоксии [$(21,3 \pm 1,1)$ %] (рис. 1). В анализируемых образцах гемолимфы присутствовало незначительное количество мёртвых клеток: их доля в контрольных и опытных пробах не превышала 1,5 %.

Анализ характера распределения частиц по прямому и боковому рассеянию (forward scattering и side scattering соответственно; далее — FS и SS) позволил идентифицировать две субпопуляции клеток с разным относительным размером и уровнем гранулярности (рис. 2).

Различия были статистически достоверными. Субпопуляция 1 характеризовалась высокими значениями относительного размера $[(1282,7 \pm 89,3) \text{ у. е.}]$ и гранулярности $[(199,2 \pm 21,7) \text{ у. е.}]$. Согласно данным калибровки протокола латексными микрочастицами, средний диаметр клеток составлял 14–15 мкм. Вероятно, вытянутость облака распределения клеток по оси SS обусловлена различиями в размере ядра и количеством гранул в цитоплазме. Субпопуляция 2 была неоднородной по значениям прямого и бокового рассеяния $[(181,8 \pm 18,4) \text{ у. е.}]$ и имела сравнительно низкие значения относительного размера $[(392,8 \pm 36,1) \text{ у. е.}]$, что соответствовало среднему диаметру клеток 7–8 мкм. Неоднородность облака распределения свидетельствует о наличии нескольких подтипов клеток среди амёбоцитов, однако идентифицировать эти подтипы существующими методами не представляется возможным. Основываясь на классификации гемоцитов (Dang et al., 2013), субпопуляцию 1 идентифицировали как эритроциты, а субпопуляцию 2 — как амёбоциты.

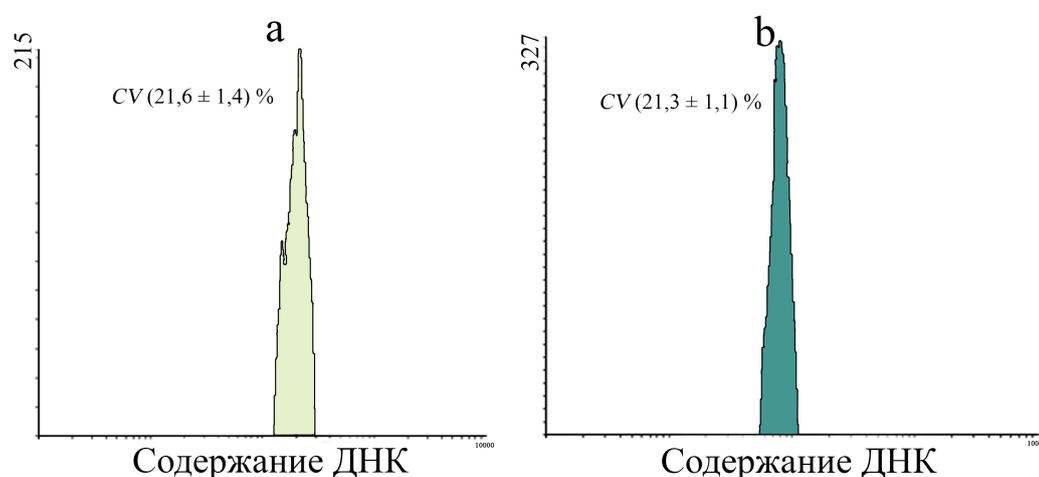


Рис. 1. Содержание ДНК в гемоцитах анадары: а — нормоксия; б — гипоксия

Fig. 1. DNA content in ark clam hemocytes: a – normoxia; b – hypoxia

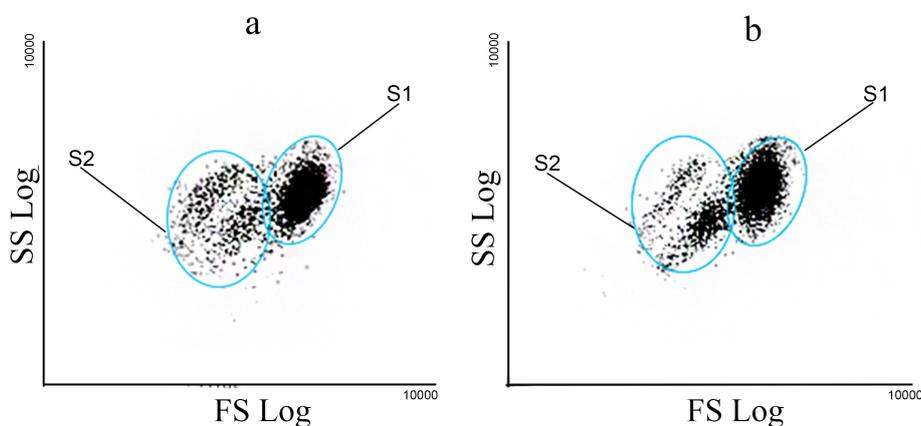


Рис. 2. Клеточный состав гемолимфы анадары. S1 — эритроциты; S2 — амёбоциты; а — нормоксия; б — гипоксия

Fig. 2. Cellular composition of ark clam hemolymph. S1 – erythrocytes; S2 – amebocytes; a – normoxia; b – hypoxia

Клеточный состав гемолимфы *A. kagoshimensis* после суточной инкубации в условиях гипоксии не претерпел каких-либо изменений (рис. 3а). Доля гранулярных клеток — эритроцитов — в гемолимфе моллюсков опытной и контрольной групп фактически совпала: ($92,6 \pm 0,9$) и ($93,9 \pm 1,9$) % соответственно. Аналогично в отношении агранулярных клеток — амёбоцитов: ($7,4 \pm 0,9$) % — нормоксия; ($6,3 \pm 1,9$) % — гипоксия.

Обе субпопуляции клеток характеризовались выраженной флуоресценцией красителя DCF-DA при нормоксии: ($2439,5 \pm 189,0$) у. е. для крупных клеток и ($4104,3 \pm 556,7$) у. е. для мелких; это указывает на активную продукцию ими АФК. Различия во флуоресценции красителя статистически не достоверны. Суточная гипоксия не привела к статистически значимым изменениям флуоресценции DCF-DA у *A. kagoshimensis* (рис. 3б).

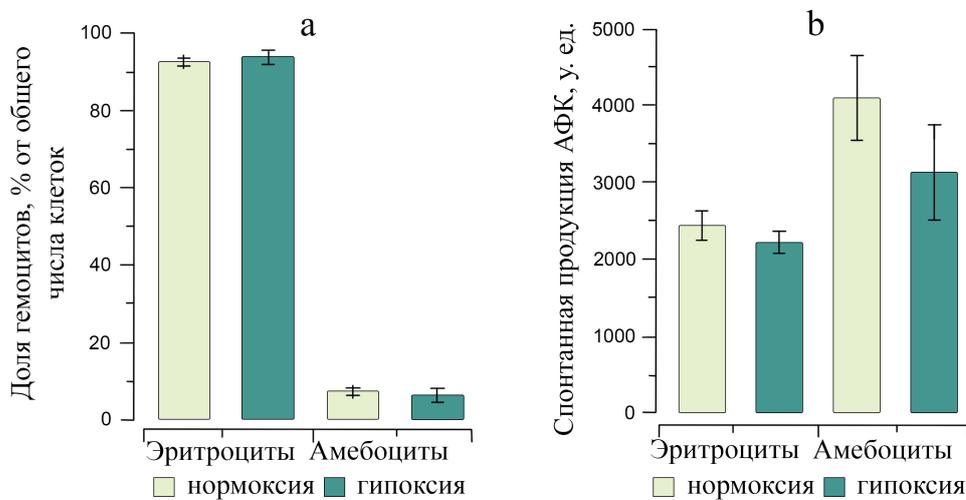


Рис. 3. Влияние гипоксии на клеточный состав гемолимфы анадары (а) и способность гемоцитов к генерации активных форм кислорода (б)

Fig. 3. Hypoxia impact on cellular composition of ark clam hemolymph (a) and hemocytes capacity to produce reactive oxygen species (b)

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что инкубация в условиях дефицита кислорода может индуцировать снижение общего количества гемоцитов (Mydlarz et al., 2006). Показано, что у *Mytilus coruscus* и *Perna viridis* после инкубации в условиях гипоксии доля мёртвых клеток увеличивалась (Sui et al., 2016 ; Wang et al., 2012), а у *M. galloprovincialis* их количество не изменялось (Andreyeva et al., 2019). Мы не определяли абсолютное число гемоцитов. В нашем исследовании гипоксия не привела к увеличению гибели клеток, что, вероятно, свидетельствует о нормальном функционировании гемоцитов анадары в условиях краткосрочной гипоксии. Различия могут объясняться продолжительностью воздействия и уровнем толерантности видов к дефициту кислорода.

При помощи метода проточной цитометрии идентифицировано две субпопуляции клеток с разным относительным размером и уровнем гранулярности, что в целом согласуется с данными, полученными на других видах двустворчатых моллюсков (Andreyeva et al., 2019 ; Sussarellu et al., 2013 ; Wang et al., 2012). Субпопуляция 1 идентифицирована как клетки гранулярного типа — эритроциты, согласно классификации Dang et al. (2013). Субпопуляция 2 идентифицирована как клетки агранулярного типа — амёбоциты (Dang et al., 2013). Обе субпопуляции клеток характеризуются выраженной флуоресценцией красителя DCF-DA, что не является типичным

для других видов двустворчатых моллюсков (*M. galloprovincialis*, *O. edulis* и *C. gigas*). Считается, что гранулярные гемоциты не только отвечают за газотранспортную функцию, но и более активны, в сравнении с агранулярными, в проявлении иммунных реакций: фагоцитоза, продукции защитных пептидов и АФК. Генерация окислительного взрыва играет важную роль в защите от микроорганизмов, поскольку АФК в сочетании с лизосомальными ферментами принимают участие в реакции фагоцитоза, способствуя уничтожению условно патогенных объектов (Sussarellu et al., 2013). Отсутствие различий в способности генерировать АФК между агранулярными и гранулярными клетками может свидетельствовать об отсутствии функциональной дифференциации гемоцитов анадары. Последнее согласуется с данными ранее проведённых исследований на представителях семейства Arcidae (Dang et al., 2013).

Способность к продукции АФК непосредственно зависит от содержания кислорода в окружающей среде, поскольку основной источник свободных радикалов — это митохондрии и эндоплазматическая сеть (Wang et al., 2012). Многие авторы считают, что гипоксия вызывает снижение способности к продукции АФК у других видов двустворчатых моллюсков, подавляя окислительную защиту (Sui et al., 2016 ; Widdows et al., 1989). Механизм, лежащий в основе поддержания продукции АФК гемоцитами в условиях дефицита кислорода, до конца не ясен. Считается, что гипоксия может индуцировать окислительно-восстановительные изменения на уровне переносчиков электронов, что приводит к генерации окислительного взрыва на уровне митохондриального комплекса III (Chandel et al., 2000). В этом может принимать участие гемоглобин (Jiang et al., 2007). Показано, что после деоксигенации гемоглобин приобретает псевдопероксидазную активность, способную катализировать выработку супероксид-иона (Kawano et al., 2002). Следовательно, пероксидазная активность гемоглобина анадары может индуцировать продукцию АФК (Bao et al., 2016), поддерживая способность к иммунному ответу в условиях гипоксии. В нашем случае суточная гипоксия не индуцирует изменения во флуоресценции DCF-DA у *A. kagoshimensis*. Отсутствие этих изменений в настоящей работе может свидетельствовать о достаточных компенсаторных механизмах анадары для поддержания нормального функционального состояния эндоплазматической сети и митохондрий в условиях суточной гипоксии.

Заключение. При помощи метода проточной цитометрии в гемолимфе моллюска *Anadara kagoshimensis* идентифицированы две группы клеток — гранулоциты (представлены эритроцитами) и агранулоциты (амёбоциты). Доля гранулоцитов в гемолимфе моллюсков превышает 90 % от общего числа клеток. Суточная гипоксия не приводит к изменениям клеточного состава гемолимфы анадары. Способность к продукции активных форм кислорода и уровень смертности гемоцитов у моллюсков экспериментальной группы остаются на уровне контрольных значений (нормоксия). Результаты проведённого исследования свидетельствуют о толерантности *A. kagoshimensis* к острому дефициту кислорода.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4) и при частичной поддержке РФФИ (проект № 20-04-00037).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Новицкая В. Н., Солдатов А. А. Эритроидные элементы гемолимфы *Anadara inaequivalvis* (Mollusca: Arcidae) в условиях экспериментальной аноксии: функциональные и морфометрические характеристики. *Морской экологический журнал*. 2011. Т. 10, № 1. С. 56–64. [Novitskaya V. N., Soldatov A. A. Erythroid elements of hemolymph in *Anadara inaequivalvis* (Mollusca: Arcidae) under conditions of experimental anoxia: Functional and morphometric characteristics. *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2011, vol. 10, no. 1, pp. 56–64. (in Russ.)]

2. Яхонтова И. В., Дергалева Ж. Т. Марикультура моллюсков на Черноморском побережье России // *Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов*. 2008. № 2. С. 45–47. [Yakhontova I. V., Dergaleva Zh. T. Marikul'tura mollyuskov na Chernomorskom poberezh'e Rossii. *Rybprom: tekhnologii i oborudovanie dlya pererabotki vodnykh bioresursov*, 2008, no. 2, pp. 45–47. (in Russ.)]
3. Andreyeva A. Y., Efremova E. S., Kukhareva T. A. Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, vol. 89, pp. 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.017>
4. Baker S. M., Mann R. Effects of hypoxia and anoxia on larval settlement, juvenile growth, and juvenile survival of the oyster *Crassostrea virginica*. *The Biological Bulletin*, 1992, vol. 182, no. 2, pp. 265–269. <https://doi.org/10.2307/1542120>
5. Bao Y., Wang J., Li C., Li P., Wang S., Lin Z. A preliminary study on the antibacterial mechanism of *Tegillarca granosa* hemoglobin by derived peptides and peroxidase activity. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, vol. 51, pp. 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.004>
6. Boyd J. N., Burnett L. E. Reactive oxygen intermediate production by oyster hemocytes exposed to hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 1999, vol. 202, no. 22, pp. 3135–3143.
7. Chandel N. S., McClintock D. S., Feliciano C. E., Wood T. M., Melendez J. A., Rodriguez A. M., Schumacker P. T. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia a mechanism of O₂ sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no. 33, pp. 25130–25138. <https://doi.org/10.1074/jbc.m001914200>
8. Cortesi P., Cattani O., Vitali G., Carpené E., De Zwaan A., Van den Thillart G., Weber R. E. Physiological and biochemical responses of the bivalve *Scapharca inaequivalvis* to hypoxia and cadmium exposure: Erythrocytes versus other tissues. *Marine Coastal Eutrophication*, 1992, pp. 1041–1053. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-89990-3.50090-0>
9. Dang C., Cribb T. H., Osborne G., Kawasaki M., Bedin A. S., Barnes A. C. Effect of a hemiuroid trematode on the hemocyte immune parameters of the cockle *Anadara trapezia*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, vol. 35, iss. 3, pp. 951–956. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.010>
10. De Zwaan A., Cortesi P., Van den Thillart G., Roos J., Storey K. B. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: A biochemical analysis. *Marine Biology*, 1991, vol. 111, no. 3, pp. 343–351. <https://doi.org/10.1007/BF01319405>
11. Diaz R. J., Rosenberg R. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, 2008, vol. 321, iss. 5891, pp. 926–929. <https://doi.org/10.1126/science.1156401>
12. Donaghy L., Artigaud S., Sussarellu R., Lambert C., Le Goic N., Hégaret H., Soudant P. Tolerance of bivalve mollusc hemocytes to variable oxygen availability: A mitochondrial origin? *Aquatic Living Resources*, 2013, vol. 26, no. 3, pp. 257–261. <https://doi.org/10.1051/alr/2013054>
13. Hermes-Lima M., Moreira D. C., Rivera-Ingraham G. A., Giraud-Billoud M., Genaro-Mattos T. C., Campos É. G. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, vol. 89, pp. 1122–1143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156>
14. Holden J. A., Pipe R. K., Quaglia A., Ciani G. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequivalvis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1994, vol. 74, iss. 2, pp. 287–299. <https://doi.org/10.1017/S0025315400039333>
15. Isani G., Cattani O., Tacconi S., Carpené E., Cortesi P. Energy metabolism during anaerobiosis and the recovery of the posterior adductor muscle of *Scapharca inaequivalvis*. *Nova Thalassia*, 1986, vol. 8, no. 3, pp. 575–576.
16. Jiang N., Tan N. S., Ho B., Ding J. L. Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. *Nature Immunology*, 2007, vol. 8, no. 10, pp. 1114–1122. <https://doi.org/10.1038/ni1501>
17. Kawano T., Pinontoan R., Hosoya H., Muto S. Monoamine-dependent production of reactive oxygen species catalyzed by pseudoperoxidase activity of human hemoglobin.

- Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, vol. 66, iss. 6, pp. 1224–1232. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1224>
18. Miyamoto Y., Iwanaga C. Biochemical responses to anoxia and hypoxia in the ark shell *Scapharca kagoshimensis*. *Plankton and Benthos Research*, 2012, vol. 7, iss. 4, pp. 167–174. <https://doi.org/10.3800/pbr.7.167>
19. Mydlarz L. D., Jones L. E., Harvell C. D. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2006, vol. 37, pp. 251–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110103>
20. Nicholson S., Morton B. The hypoxia tolerances of subtidal marine bivalves from Hong Kong. In: *The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China V* : proceedings of the Tenth International Marine Biological Workshop, Hong Kong, 6–26 Apr., 1998. Hong Kong : Hong Kong University, 2000, pp. 229–239.
21. Novitskaya V. N., Soldatov A. A. Peculiarities of functional morphology of erythroid elements of hemolymph of the bivalve mollusk *Anadara inaequalis*, the Black Sea. *Hydrobiological Journal*, 2013, vol. 49, no. 6, pp. 64–71. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v49.i6.60>
22. Soldatov A. A., Sysoeva I. V., Sysoev A. A., Andreyenko T. I. Adenylate system of tissues of the bivalve mollusk *Anadara inaequalis* under experimental anoxia. *Hydrobiological Journal*, 2010, vol. 46, no. 5, pp. 60–67. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v46.i5.70>
23. Soldatov A. A., Kukhareva T. A., Andreeva A. Y., Efremova E. S. Erythroid elements of hemolymph in *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) under conditions of the combined action of hypoxia and hydrogen sulfide contamination. *Russian Journal of Marine Biology*, 2018, vol. 44, iss. 6, pp. 452–457. <https://doi.org/10.1134/S1063074018060111>
24. Sui Y., Kong H., Shang Y., Huang X., Wu F., Hu M., Wang Y. Effects of short-term hypoxia and seawater acidification on hemocyte responses of the mussel *Mytilus coruscus*. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, vol. 108, iss. 1–2, pp. 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.001>
25. Sussarellu R., Fabioux C., Sanchez M. C., Le Goïc N., Lambert C., Soudant P., Moraga D. Molecular and cellular response to short-term oxygen variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2012, vol. 412, pp. 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.11.007>
26. Sussarellu R., Dudoignon T., Fabioux C., Soudant P., Moraga D., Kraffe E., Rapid mitochondrial adjustments in response to short-term hypoxia and re-oxygenation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology*, 2013, vol. 216, no. 9, pp. 1561–1569. <https://doi.org/10.1242/jeb.075879>
27. Sussarellu R., Fabioux C., Le Moullec G., Fleury E., Moraga D. Transcriptional response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Marine Genomics*, 2010, vol. 3, no. 3–4, pp. 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2010.08.005>
28. Wang Y., Hu M., Cheung S. G., Shin P. K. S., Lu W., Li J. Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity. *Aquaculture*, 2012, vol. 356, pp. 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.001>
29. Wang W. X., Widdows J. Physiological responses of mussel larvae *Mytilus edulis* to environmental hypoxia and anoxia. *Marine Ecology Progress Series*, 1991, vol. 70, no. 3, pp. 223–236.
30. Widdows J., Newell R. I. E., Mann R. Effects of hypoxia and anoxia on survival, energy metabolism, and feeding of oyster larvae (*Crassostrea virginica*, Gmelin). *The Biological Bulletin*, 1989, vol. 177, no. 1, pp. 154–166. <https://doi.org/10.2307/1541843>
31. Wu R. S. S. Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, vol. 45, iss. 1–12, pp. 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00061-9)
32. Zwaan A., Isani G., Cattani O., Cortesi P. Long-term anaerobic metabolism of erythrocytes of the arcid clam *Scapharca inaequalis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1995, vol. 187, iss. 1, pp. 27–37. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)00168-D](https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)00168-D)

**IMPACT OF 24-HOUR HYPOXIA
ON HEMOCYTE FUNCTIONS
OF *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)**

E. S. Kladchenko, A. Yu. Andreyeva, T. A. Kukhareva, V. N. Rychkova, and A. A. Soldatov

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: kladchenko_ekaterina@bk.ru

Shellfish farms are usually located in coastal areas, where molluscs can be exposed to hypoxia. Cultivating at low oxygen levels causes general disruptions of growth rate, outbreaks of diseases, and mollusc mortality. Impact of short-term hypoxia on hemocyte functions of ark clam (*Anadara kagoshimensis*) was investigated by flow cytometry. A control group was incubated at 6.7–6.8 mg O₂·L⁻¹, an experimental one – at 0.4–0.5 mg O₂·L⁻¹. Exposition lasted for 24 hours. Hypoxia was created by blowing seawater in shellfish tanks with nitrogen gas. In ark clam hemolymph, 2 groups of hemocytes were identified on the basis of arbitrary size and arbitrary granularity: granulocytes (erythrocytes) and agranulocytes (amebocytes). Erythrocytes were the predominant cell type in *A. kagoshimensis* hemolymph, amounting for more than 90 %. No significant changes in cellular composition of ark clam hemolymph were observed. The production of reactive oxygen species and hemocyte mortality in the experimental group also remained at control level. The results of this work indicate ark clam tolerance to hypoxia.

Keywords: ark clam, marine cultivating, flow cytometry, hematological parameters, reactive oxygen species